

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results	Display Selected	Format Free
--	---	---------------------	--------------	------------------	----------------

1. 2/5/1 DIAL OG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

010458776

WPI Acc No: 1995-360095/199547

XRAM Acc No: C95-157475

Fructosyl lysine oxidase enzymes produced by Fusarium or Gibberella spp. - useful for determin. of amadori cpds. in blood or food prods.

Patent Assignee: KYOTO DAIICHI KAGAKU CO LTD (KYOT-N); KYOTO DAIICHI KAGAKU KK (KYOT-N)

Inventor: FUNATSU F; KATO N; SAKAI Y; TANI Y; YAGI M

Number of Countries: 008 Number of Patents: 010

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 678576	A2	19951025	EP 95102866	A	19950301	199547 B
JP 7289253	A	19951107	JP 9542880	A	19950302	199602
EP 678576	A3	19951213	EP 95102866	A	19950301	199619
US 5789221	A	19980804	US 95396761	A	19950301	199838
JP 2923222	B2	19990726	JP 9542880	A	19950302	199935
JP 11243950	A	19990914	JP 9542880	A	19950302	199948
			JP 98342808	A	19950302	
US 5972671	A	19991026	US 95396761	A	19950301	199952
			US 9830442	A	19980225	
EP 678576	B1	20010103	EP 95102866	A	19950301	200102
DE 69519760	E	20010208	DE 619760	A	19950301	200115
			EP 95102866	A	19950301	
JP 3416540	B2	20030616	JP 9542880	A	19950302	200340
			JP 98342808	A	19950302	

Priority Applications (No Type Date): JP 9433488 A 19940303

Cited Patents: 1. Jnl. Ref: EP 526150; EP 576838; JP 5192193; JP 6046846

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

EP 678576	A2	E	37	C12N-009/06	
				Designated States (Regional):	CH DE FR GB IT LI
JP 7289253	A		21	C12N-009/06	
EP 678576	A3			C12N-009/06	
US 5789221	A			C12N-009/04	
JP 2923222	B2		20	C12N-009/06	Previous Publ. patent JP 7289253
JP 11243950	A		21	C12N-009/06	Div ex application JP 9542880
US 5972671	A			C12N-009/06	Div ex application US 95396761
					Div ex patent US 5789221
EP 678576	B1	E		C12N-009/06	
				Designated States (Regional):	CH DE FR GB IT LI
DE 69519760	E			C12N-009/06	Based on patent EP 678576
JP 3416540	B2		20	C12N-009/06	Div ex application JP 9542880
					Previous Publ. patent JP 11243950

Abstract (Basic): EP 678576 A

Fructosyl amino acid oxidase (I) produced by culturing an (I)-producing Fusarium or Gibberella strain in a medium contg. fructosyl lysine is new.

Also claimed are: (1) Fusarium oxysporum S-1F4 (FERM BP-5010); (2) a process for producing a glycosyl amino acid, comprising autoclaving a soln. contg. a monosaccharide and an opt. protected amino acid at 100-150 deg. C; (3) a medium contg. fructosyl lysine and/or fructosyl N alpha -lysine, prep'd. by autoclaving a mixt. contg. 0.01-50 wt. %

glucose, 0.01-20 wt. % lysine and/or fructosyl N alpha -lysine, 0.1 wt. % K₂HPO₄, 0.1 wt. % NaH₂PO₄, 0.05 wt. % MgSO₄.7H₂O, 0.01 wt. % CaCl₂.2H₂O and 0.2 wt. % yeast extract at 100-150 deg. C for 3-60 mins.; (4) a process for producing a fructosyl amino acid oxidase by culturing a fungus in a medium contg. opt. protected fructosyl lysine and/or glycated protein; (5) an assay for an amadori cpd. in a sample, comprising contacting the sample with (1) and determining the amt. of O₂ consumed or the amt. of H₂O₂ generated, and (6) a reagent or kit for the assay of Amadori cpds., comprising (1).

USE - Assays for amadori cpds. in blood are useful for the diagnosis of diabetes and assays for amadori cpds. in food prods. are useful for assessing their state of preservation and age.

ADVANTAGE - Unlike prior art fructosyl amino acid oxidase enzymes, (1) is specific for fructosyl lysine and thus provides more accurate and reproducible assays.

Dwg. 0/17

Title Terms: FRUCTOSYL; LYSINE; OXIDASE; ENZYME; PRODUCE; FUSARIUM; GIBBERELLA; SPECIES; USEFUL; DETERMINE; AMADORI; COMPOUND; BLOOD; FOOD; PRODUCT

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-009/04; C12N-009/06

International Patent Class (Additional): C07C-229/46; C07H-015/12; C12N-001/14; C12N-001/26; C12N-009/02; C12N-009/08; C12Q-001/26; C12R-001-77; C12N-009/06; C12R-001-645

File Segment: CPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

Select All **Display Selected** **Format**
 Clear Selections **Print/Save Selected** **Send Results** **Free**

© 2005 Dialog, a Thomson business

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-289253

(43)公開日 平成7年(1995)11月7日

(51)Int.Cl.⁶
C 12 N 9/06
C 07 C 229/46
C 12 N 1/14
C 12 Q 1/26
// C 12 N 9/06

識別記号 B
序内整理番号 7537-4H
A 8828-4B
6807-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全21頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-42880
(22)出願日 平成7年(1995)3月2日
(31)優先権主張番号 特願平6-33488
(32)優先日 平6(1994)3月3日
(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000141897
株式会社京都第一科学
京都府京都市南区東九条西明田町57番地
(72)発明者 加藤 鶴夫
京都府亀岡市西つじヶ丘美山台2丁目3番18号
(72)発明者 阪井 康能
滋賀県大津市本宮2丁目40-8
(72)発明者 谷 ▲吉▼樹
京都府京都市北区上賀茂菖蒲園町56, 60番合地-1
(74)代理人 弁理士 青山 葵 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ及びその製造方法

(57)【要約】

【構成】フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生能を有するフサリウム属 (Fusarium) 又はギベレラ属 (Gibberella) の菌をフルクトシリジン及び/又はフルクトシル N^α-Z-リジン含有培地で培養することにより产生されるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (FLO D) 、その製造方法、該FLO Dを用いるアマドリ化合物の分析法、該分析法のための試薬及びキット。

【効果】新たな臨床分析及び食品分析法の開発に有用であり、特に糖尿病の病状の診断及び症状の管理、食品の品質管理の促進に寄与し得る。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生能を有するフサリウム属 (*Fusarium*) 又はギベレラ属 (*Gibberella*) の菌をフルクトシルリジン含有培地で培養することにより產生されるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項2】 フルクトシルリジン含有培地が、グルコースと、リジン及び／又はN^α-Z-リジンとを温度100～150℃において3～60分間オートクレーブ処理することにより得られるフルクトシルリジンを含有するものである請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項3】 フサリウム属の菌が、フサリウム・オキシスボルムS-1F4 (*Fusarium oxysporum* S-1F4) (FERM BP-5010) である請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項4】 下記の理化学的特性を有するものである請求項1、2又は3に記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ：

- 1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 α -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒し；
- 2) 安定pHは4.0～12.0、至適pHは8.0であり；
- 3) 安定温度は20～55℃、至適温度は45℃であり；
- 4) セファクリルS-200カラムを用いたゲルろ過法で測定した場合、分子量は約45,000 (45kDa) a) である。

【請求項5】 ギベレラ属の菌が、ギベレラ・フジクロイ (IFO NO. 6356) (*Gibberella fujikuroi*) 又はギベレラ・フジクロイ (IFO NO. 6605) (*Gibberella fujikuroi*) である請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項6】 下記の理化学的特性を有するものである請求項1、2又は5に記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ：

- 1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 α -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒し；
- 2) 至適pHは8.0であり；
- 3) 安定温度は20～50℃、至適温度は35℃であり；
- 4) スーパーデックス200pgを用いたゲルろ過法で測定した場合、分子量は約47,000 (47kDa) である。

【請求項7】 フサリウム・オキシスボルムS-1F4 (*Fusarium oxysporum* S-1F4) (FERM BP-5010)。

【請求項8】 単糖類と、遊離あるいは保護基を有する

2

アミノ酸とを溶液中で共存させ、高温加圧処理することを特徴とする糖化アミノ酸の製造方法。

【請求項9】 グルコース0.01～50重量%とリジン及び／又はN^α-Z-リジン0.01～20重量%とを溶液中で100～150℃において3～60分間オートクレーブ処理することによりフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N^α-Z-リジンを製造することを特徴とする請求項8記載の方法

【請求項10】 グルコース0.01～50重量%、リジン及び／又はN^α-Z-リジン0.01～20重量%、K₂HPO₄ 0.1重量%、NaH₂PO₄ 0.1重量%、MgSO₄·7H₂O 0.05重量%、CaCl₂·2H₂O 0.01重量%及び酵母エキス0.2重量%を含有する混合物を100～150℃において3～60分間オートクレーブ処理することにより得られることを特徴とする、フルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N^α-Z-リジン含有培地。

【請求項11】 遊離又は保護基を有するアミノ酸の糖化物及び／又はタンパクの糖化物を含有する培地で、真菌類を培養することによって該真菌類にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを产生させることを特徴とする、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造方法。

【請求項12】 フサリウム属又はギベレラ属に属し、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生能を有する菌株をフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N^α-Z-リジン含有培地に培養し、培養物からフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを回収することを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項13】 アマドリ化合物を含有する試料と、請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを接触させ、酸素の消費量又は過酸化水素の発生量を測定することを特徴とする、試料中のアマドリ化合物の分析法。

【請求項14】 試料が生体成分であり、アマドリ化合物の分析が、該生体成分中の糖化タンパクの量及び／又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量によりなされることを特徴とする請求項13記載の方法。

【請求項15】 請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを含有するアマドリ化合物の分析のための試薬又はキット。

【請求項16】 生体成分中の糖化タンパクの量及び／又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量のために用いられることを特徴とする請求項15記載の分析試薬又はキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なフルクトシルアミノ酸オキシダーゼに関し、さらに詳しくは、フサリウム属 (*Fusarium*) 又はギベレラ属 (*Gibberella*) の菌由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、該酵素の製造方法、該酵素を用いたアマドリ化合物の分析法、及び該

酵素を含有する試薬及びキットに関する。また本発明は、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生菌のスクリーニング及び/又は培養のために有用な、該酵素の基質としてのフルクトシルリジン及び/又はフルクトシルN^α-Z-リジンの製造方法、並びにフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生菌のスクリーニング及び/又は培養のためにフルクトシルリジン及び/又はフルクトシルN^α-Z-リジン含有培地を提供するものである。

【0002】

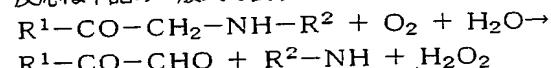
【従来技術】アマドリ化合物は、タンパク質、ペプチド及びアミノ酸のようなアミノ基を有する物質と、アルドースのような還元性の糖が共存する場合、アミノ基とアルデヒド基が非酵素的かつ非可逆的に結合し、アマドリ転移することにより生成される。アマドリ化合物の生成速度は、反応性物質の濃度、接触時間、温度などの関数で表される。従って、その生成量から、それら反応性物質を含有する物質に関する様々な情報を得ることができると考えられている。アマドリ化合物を含有する物質としては、醤油等の食品、及び血液等の体液がある。生体では、グルコースとアミノ酸が結合したアマドリ化合物であるフルクトシルアミン誘導体が生成している。例えば、血液中のヘモグロビンが糖化されたフルクトシルアミン誘導体はグリコヘモグロビン、アルブミンが糖化された誘導体はグリコアルブミン、血液中のタンパクが糖化された誘導体はフルクトサミンと呼ばれる。これらの血中濃度は、過去の一定期間の平均血糖値を反映しており、その測定値は、糖尿病の病状の診断及び症状の管理の重要な指標となり得るために、測定手段の確立は臨床 上、極めて有用である。また、食品中のアマドリ化合物を定量することにより、その食品の製造後の保存状況や期間を知ることができ、品質管理に役立つと考えられる。このように、アマドリ化合物の定量分析は医学及び食品を含む広範な分野で有用である。

【0003】従来、アマドリ化合物の定量法としては、高速液体クロマトグラフィを利用する方法 [Chromatogr. Sci. 10:659(1979)]、ホウ酸を結合させた固体をつめたカラムを用いる方法 [Clin. Chem. 28:2088(1982)]、電気泳動 [Clin. Chem. 26:1598(1980)]、抗原一抗体反応を利用する方法 [J. J. C. L. A. 18: 620(1993), 機器・試薬 16: 33-37(1993)], フルクトサミンの測定法 [Clin. Chem. Acta 127: 87-95 (1982)], チオバルビツール酸を用いて酸化後比色定量する方法 [Clin. Chem. Acta 112: 179-204 (1981)]などが知られているが、高価な機器が必要であつたり、必ずしも正確で迅速な方法ではなかつた。

【0004】近年、酵素の有する特性（基質、反応、構造、位置などの特異性）に起因して、選択的に目的物質を迅速かつ正確に分析することができることから、酵素反応を利用する方法が臨床分析や食品分析の分野で普及してきた。既に、アマドリ化合物に酸化還元酵素を作用させ、その反応における酵素の消費量又は過酸化水素の

発生量を測定することにより、アマドリ化合物を定量する分析法が提案されている（例えば、特公平5-3399号公報、特公平6-65300号公報、特開平2-195900号公報、特開平3-155780号公報、特開平4-4874号公報、特開平5-192193号公報、特開平6-46846号公報）。さらに、糖尿病の診断のための糖化タンパクの定量法も開示されている（特開平2-195899号公報、特開平2-19590号公報、特開平5-192193号公報、特開平6-46846号公報）。

【0005】アマドリ化合物の酸化還元酵素による分解反応は下記の一般式で表すことができる。



（式中、R¹はアルドース残基、R²はアミノ酸、タンパク質又はペプチド残基を表す）

上記の反応を触媒する酵素として、例えば、菌由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ [コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属の菌 (特公平6-65300号公報、特公平5-33997号公報)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) の菌 (特開平3-155780号公報)]、菌由来のケトアミノオキシダーゼ [コリネバクテリウム属、フサリウム属、アクレモニウム属又はデブリオマイセス属 (特開平5-192193号公報)] カンジダ (*Candida*) 属の菌由来のフルクトシルアミンデグリガーゼ (特開平6-46846号公報)、及びアルキルリジナーゼ [J. Biol. Chem. 239卷、第 3790-3796 頁 (1964年) 記載の方法で調製可能] 等を挙げることができる。

20 【0006】

【発明が解決すべき課題】しかしながら、これらの酵素による方法には、下記の問題点があった。即ち、糖尿病の診断における指標となる、血中のアマドリ化合物は糖化タンパクであるが、これは、通常、タンパク分子中のリジン残基のε位にグルコースが結合して生成される

[J. Biol. Chem. 26:13542-13545(1986)]。従って、糖化タンパクの測定には、フルクトシルリジンに対する特異性の高い酵素を用いる必要があった。しかし、既存のコリネバクテリウム属由来の酵素はフルクトシルリジンには作用せず、アスペルギルス属由来の酵素はフルクトシルリジンに作用するものの、他のアマドリ化合物に対する活性に比べて、フルクトシルリジンに対する活性が低く（後述の表5参照）、糖化タンパク又はその加水分解物に対する作用については明らかにされていない。他方、特開平5-192193号公報記載のケトアミノオキシダーゼはフルクトシルバリンのα-アミン基の糖化に対して特異的に作用する酵素であり、リジン残基に糖が結合している糖化タンパクを正確に測定することはできない。フルクトシルアミンデグリガーゼは、ジフルクトシルリジンに高い活性があるのでリジン残基のε位の

糖化物を特異的に測定することができない。さらに、アルキルリジナーゼを用いる方法は糖類以外がリジンに結合した物質に対しても作用し、糖化物に対する特異性が低いという問題があり、正確な測定が期待できなかつた。このように、従来の酵素は糖化タンパクの正確な定量には適さず、フルクトシルリジンに対する特異性が高い酵素の開発が待たれていた。一般的に、酵素を用いる分析法が正確かつ有用となるためには、分析の目的に最適な酵素を選択する必要がある。即ち、酵素の基質である被検物質の種類、測定試料の状態、測定条件など、種々の条件を考慮して適切な酵素を用いなければ、再現性のある正確な分析を行う事ができない恐れがある。そのような酵素を選択するためには、予め様々な酵素について、活性、基質特異性、温度安定性、pH安定性などが特定されていなければならない。従って、より多くのフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを製造し、それらの特性を明らかにしておくことが望ましい。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、アマドリ化合物、特に糖化タンパクに特異的に作用する新規なフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを提供することを目的として鋭意研究を重ねた結果、フサリウム属 (*Fusarium* m) 又はギベレラ属 (*Gibberella*) の菌をフルクトシルリジン及び/又はフルクトシル N^α-Z-リジンの存在下で培養すると、目的の酵素が產生されることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、フサリウム属 (*Fusarium*) 又はギベレラ属 (*Gibberella*) の菌を、フルクトシルリジン及び/又はフルクトシル N^α-Z-リジン含有培地で培養することにより产生されるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを提供するものである。本発明のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ產生菌の培養に用いるフルクトシルリジン及び/又はフルクトシル N^α-Z-リジン含有培地は、グルコースと、リジン及び/又はN^α-Z-リジンとを温度100～150℃において3～60分間、オートクレーブ処理することにより得られるフルクトシルリジン及び/又はフルクトシル N^α-Z-リジン（以下、F Z Lと略称することもある）を含有する。従って、本発明のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼはフルクトシルリジン及び/又はF Z Lに特異的に作用する酵素である。なお、本明細書中では、本発明のフルクトシルリジン及び/又はF Z Lに特異的なフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをフルクトシルリジン・オキシダーゼ(fructosyl lysine oxidase)と同意義に用いることとし、以下、F L O Dと略称することもある。本発明の酵素は、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ產生能を有するフサリウム属又はギベレラ属の菌をフルクトシルリジン及び/又はフルクトシル N^α-Z-リジン含有培地で培養することにより製造することができる。

【0008】そのようなフサリウム属の菌として、フサ

リウム・オキシスポルムS-1 F 4 (*Fusarium oxysporum* S-1 F 4) (FERM BP-5010) を挙げることができる。また、ギベレラ属の菌として、ギベレラ・フジクロイ (IFO NO. 6356) (*Gibberella fujikuroi*) 又はギベレラ・フジクロイ (IFO NO. 6605) (*Gibberella fujikuroi*)などの種を挙げるこ

とができる

【0009】本発明はまた、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ產生菌のスクリーニング及び/又は培養のため に有用な、該酵素の基質としてのフルクトシルリジン及び/又はフルクトシル N^α-Z-リジンの製造方法、並びにフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ產生菌の培養のためのフルクトシルリジン及び/又はフルクトシル N^α-Z-リジン含有培地を提供するものである。従来、糖化タンパクは特開平2-69664記載の方法で化学合成されているが、合成には8日間以上を要し、操作が複雑で実用的でなかった。本発明者らは、単糖類と、遊離あるいは保護基を有するアミノ酸とを溶液中で共存させ、100～150℃でオートクレーブ処理することにより、糖化アミノ酸を容易に製造することができるを見出した。例えば、グルコースと、リジン及び/又はN^α-Z-リジンとを溶液中でオートクレーブ処理することにより、目的のフルクトシルリジン及び/又はF Z Lが容易に得られる。本発明の目的から、N^α-Z-リジンがより好ましい。従って、本発明は、単糖類と、遊離あるいは保護基を有するアミノ酸とを溶液中で共存させ、100～150℃でオートクレーブ処理することを特徴とする、糖化アミノ酸の製造方法を提供するものである。また、本発明は、グルコース0.01～50重量%とN^α-Z-リジン0.01～20重量%とを溶液中で、100～150℃において3～60分間オートクレーブ処理することを特徴とするフルクトシル N^α-Z-リジンの製造方法を提供するものである。

【0010】上記のごとく、フルクトシルリジン及び/又はF Z Lはグルコース0.01～50重量%とリジン及び/又はN^α-Z-リジン0.01～20重量%とを含む水溶液を、100～150℃において3～60分間オートクレーブ処理することにより、0.01～0.5%のフルクトシルリジン及び/又はフルクトシル N^α-Z-リジン水溶液として得ることができる(図1)。好ましくは、全量1000mlの溶液中にグルコース200g、N^α-Z-リジン10gを溶解させ、通常、120℃、20分間オートクレーブ処理する。精製フルクトシル N^α-Z-リジンは、上記の本発明の方法で得られたF Z L水溶液を逆相クロマトグラフィ又はイオン交換クロマトグラフィで精製することにより、得ることができる。フルクトシルリジン及び/又はF Z L含有培地は、上記の本発明の方法で得られたフルクトシルリジン及び/又はF Z Lを通常の培地に添加することによっても調製できるが、適当な混合物、即ち、グルコース0.

7

0.1～5.0重量%、リジン及び／又はN^α-Z-リジン0.01～2.0重量%、K₂HPO₄ 0.1重量%、NaH₂PO₄ 0.1重量%、MgSO₄・7H₂O 0.05重量%、CaCl₂・2H₂O 0.01重量%及び酵母エキス0.2重量%を含有する混合物（好ましくはpH 5.6～6.0）を100～150℃において3～60分間オートクレーブ処理することによっても得られる。該培地は新規であり、フルクトシルリジン及び／又はFZLを基質とするFLOD産生菌のスクリーニング及び／又は培養に有用であり、FLODの開発及び研究に貢献するものである。本発明の培地は、該培地で増殖可能であらゆる種類の菌のスクリーニングに使用することができ、そのような菌として、真菌類、例えば、フサリウム属（*Fusarium*）、ギベレラ属（*Gibberella*）、ペニシリウム属（*Penicillium*）、アスペルギルス属（*Aspergillus*）等、細菌類、例えばコリネバクテリウム属（*Corynebacterium*）等の菌を挙げることができるが、これらに限定されない。従って、本発明はまた、上記の培地を提供するものである。

【0011】本発明のFLODの製造に用いる培地としては、炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養源を含有する通常の合成あるいは天然の培地を用いることができる。炭素源としては、例えば、グルコース、キシロース、グリセリン等、窒素源としては、ペプトン、カゼイン消化物、酵母エキス、等を用いることができる。さらに無機物としてはナトリウム、カリウム、カルシウム、マンガン、マグネシウム、コバルト等、通常の培地に含有されるものを用いることができる。本発明のFLODは、フルクトシルリジン及び／又はFZL含有培地で培養したとき、最もよく誘導される。好ましい培地の例として、本発明方法で得られるフルクトシルN^α-Z-リジン（FZL）を单一の窒素源とし、炭素源としてグルコースを用いるFZL培地（1.0%グルコース、0.5%FZL、1.0%K₂HPO₄、0.1%NaH₂PO₄、0.05%MgSO₄・7H₂O、0.01%CaCl₂・2H₂O及び0.01%ビタミン混合物）を挙げることができる。特に好ましい培地は、全量1,000ml中にグルコース20g、FZL 10g、K₂HPO₄ 1.0g、NaH₂PO₄ 1.0g、MgSO₄・7H₂O 0.5g、CaCl₂・2H₂O 0.1g及び酵母エキス2.0gを含有する培地（pH 5.6～6.0）である。FZL含有培地は、通常の培地にFZLを添加するか、グルコースとN^α-Z-リジンとを含有する培地をオートクレーブ処理することによって調製することができる。いずれの方法によっても得られる培地はフルクトシルリジン及び／又はFZLの存在によって褐色を呈していることから、FZL褐変化培地又はGL（グリケーテッドリジン及び／又はグリケーテッドN^α-Z-リジン）褐変化培地と呼称される。

【0012】培養は、通常、25～37℃、好ましくは

10

20

30

40

50

28℃で行われる。培地のpHは4.0～8.0の範囲であり、好ましくは5.5～6.0である。しかしながら、これらの条件は、それぞれの菌の状態に応じて適宜調整されものであり、上記に限定されない。例えば、フサリウム・オキシスポルムS-1F4をこのような条件下、20～40時間、好ましくは24時間培養すると、FLODが培養培地に蓄積されるが、上記の好適な培地で24時間培養したとき、FLODの産生は最大になった（図2参照）。このようにして得られた培養物は、常法に従い、核酸、細胞壁断片等を除去し、酵素標品を得ることができる。通常、酵素活性は菌体中に蓄積されるので、培養物中の菌を磨碎し、酵素を抽出する。細胞の磨碎は、機械的手段又は溶媒を利用した自己消化、凍結、超音波処理、加圧などのいずれでもよい。酵素の分離精製法も既知であり、硫酸などを用いる塩析、エタノール等の有機溶媒による沈殿、イオン交換クロマトグラフィやゲルろ過、アフィニティーコロマトグラフィなどを、適宜組み合わせて行う。例えば、培養物を、遠心又は吸引ろ過して菌糸体を集め、洗浄後、0.1M Tris-HCl緩衝液（pH 8.5）に懸濁し、ダイノミルによって菌糸体を破碎する。次いで、遠心分離した上清を無細胞抽出液として、硫酸分画、DEAE-セファセリオニン交換クロマトグラフィで処理することにより精製する。

【0013】しかしながら、本発明の目的から、FLODは、その精製度にかかわらず、アマドリ化合物の酸化反応を触媒することができる限り、培養液をはじめとする、あらゆる精製段階の酵素含有液を包含する。また、酵素分子の内、触媒活性に関与する部位のみでも、本発明目的を達成することができることから、任意の、アマドリ化合物酸化活性を有するフラグメントをも包含するものとする。このようにして得られたFLODは、アマドリ化合物の定量、特に糖尿病の診断のための糖化タンパクの定量に有用である。従って、本発明は、遊離又は保護基を有するアミノ酸の糖化物及び／又はタンパクの糖化物を含有する培地で、真菌類を培養することによって該真菌類にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを産生させることを特徴とする、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造方法を提供するものである。さらに、本発明は、フサリウム属又はギベレラ属に属し、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを産生することができる菌株をフルクトシルリジン及び／又はフルクトシルN^α-Z-リジン含有培地に培養し、培養物からフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを回収することを特徴とする、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造方法を提供するものである。これらの属の菌株が产生するFLODはいずれも本発明が解決すべき技術的な課題の解決に有用である。しかしながら、その理化学的な性質がやや異なつており、本明細書では、適宜、必要に応じてフサリウム・オキシスポルムS-1F4由来のFLODをFLOD-S、ギベレラ・フジクロイ由来のFLODをFLOD-

Gと呼称する。以下、本発明を詳しく説明する。

【0014】(I) フサリウム・オキシスポルムS-1 F 4によって產生されるF LOD類該F LOD類は一般に、下記の理化学的特性を有する。

- 1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 α -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒し；
- 2) 安定pHは約4.0～12.0、至適pHは8.0であり；
- 3) 安定温度は約20～55°C、至適温度は45°Cであり；
- 4) セファクリルS-200カラムを用いたゲルろ過法で測定した場合、分子量は約45,000 (45 kD a) である。

【0015】本発明のF LOD-Sを產生する菌である、フサリウム・オキシスポルムS-1 F 4 (*Fusarium oxysporum* S-1 F 4) (以下、S-1 F 4株と称する) は本発明者らが土壤中より新規に単離した菌株であり、その菌学的特性は以下の通りである。菌の分類は、おおむねブース(C. Booth)著の「ザ・ジーナス・フサリウム(The Genus *Fusarium*)」(CMI. 1971)の記述に準拠した。

(1) 培地における生育状況

PDA培地、ポテト・スクロース寒天培地、オートミール培地における生育はいずれの培地でも非常に良好である。25°Cの恒温器で7日間培養すると、フェルト状にペトリ皿全体に広がり、白～薄い紫色を呈する。

(2) 分類学的性質

分離した菌の同定は、微生物をオートミール培地で培養し、分生子(conidia)や分生子柄(conidiophor)などの顕微鏡下の形態観察から行った。その結果、S-1 F 4株のコロニーの色は白色から薄い紫色であり、ミクロコニディア(microconidia)とマクロコニディア(macroconidia)及び厚膜胞子を多数形成する。マクロコニディアの形状が三日月型であり、3～5の隔壁を有していること、ミクロコニディアの形状が卵～長円形であり、小型分生胞子を擬頭状に形成することから、フサリウム・オキシスポルム(*Fusarium oxysporum*)と同定された。

本菌株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERM BP-5010(寄託日：平成6年2月24日)の下で寄託されている。

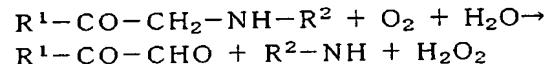
【0016】S-1 F 4株により、本発明方法に従って產生されたF LOD-Sの特性を詳細に説明する。

1. 一般的な誘導特性

F LOD-Sはフルクトシルリジン及び/又はフルクトシルN α -Z-リジン(F Z L)によって誘導される誘導酵素であり、フルクトシルリジン及び/又はF Z Lを窒素源とし、グルコースを炭素源とするフルクトシルリジン及び/又はF Z L含有培地で、フサリウム・オキシスポルムS-1 F 4を培養することにより产生される。F LOD-Sは、グルニーストリシン及び/又はN α -Z-リジンを共にオートクレーブして得られるG L褐変化培地で誘導されるが、グルコースとリジン及び/又はN α -Z-リジンを別々にオートクレーブ処理して調製した培地では誘導されないことから、該酵素はアマドリ化合物に特異的に作用するものである。また、F LOD-Sはリジン、アルギニンを用いたときに高い誘導が見られ、グリシンとリジンを比較すると、リジンを用いた場合により誘導効果が高いことから、フルクトシルリジンにより高い基質活性を有するものである。

【0017】2. 反応特異性及び基質特異性

F LOD-Sは、式：



(式中、R¹はアルドース残基、R²はタンパク残基を表す) で示される反応における触媒活性を有する。上記の反応式において、R¹が-OH、-(CH₂)_n-、又は-[CH(OH)]_n-CH₂OH (式中、nは0～6の整数) であり、R²が-CHR³-[CONHR³]_mCOOH (式中、R³は α -アミノ酸側鎖残基、mは1～480の整数を表す) で示されるアマドリ化合物が基質として好ましい。中でも、R³がリジン、ポリリジン、バリン、アスパラギンなどから選択されるアミノ酸の側鎖残基であり、またnが5～6、mが55以下である化合物が好ましい。

【0018】F LOD-Sは、部分精製酵素及び精製酵素のいずれも、F Z Lに対して高い特異性を示した。部分精製酵素は、G L褐変化培地で菌株を24時間培養した後、吸引ろ過して菌糸体を集め、洗浄後、0.1M Tris-HCl緩衝液(pH 8.5)に懸濁し、ダイノミルにて菌糸体を破碎し、遠心分離した上清を硫安分画、DEAE-セファセルイオン交換クロマトグラフィで精製することにより調製した。また、精製酵素は、後述する実施例1記載の方法に準じて調製した。結果を下記の表1及び2に示す。

表1 部分精製されたS-1 F 4由来のF LOD-Sの基質特異性

【表1】

基質	濃度	活性	比活性
			(U/ml)
フルクトシルN ^ε -Z-リジン	1.67mM	3.21	100
N ^ε -Z-リジン	1.67	N.D. ¹⁾	-
L-リジン	1.67	N.D.	-
D-グルコース	1.67	N.D.	-
D-フルクトース	1.67	N.D.	-
フルクトシルL-リジン	0.018%	0.0738	2.3
ポリ-L-リジン	0.018	N.D.	-
フルクトシルBSA	0.83	N.D.	-
BSA	0.83	N.D.	-

1) : 検出されず

【0019】表2 精製されたS-1F4由来のFLD-Sの基質特異性

【表2】

基質	濃度	比活性 (%)
フルクトシルN ^ε -Z-リジン	1.67mM	100
フルクトシルバリン	1.67	N.D. ¹⁾
N ^ε -メチル-L-リジン	1.67	N.D.
フルクトシルL-リジン	0.02%	2.3

1) : 検出されず

表1及び2から、本発明のFLD-Sは、フルクトシルN^ε-Z-リジン(FZL)に対してより高い活性を有すると共に、フルクトシルポリリジンに対しても活性があり、コリネバクテリウム属又はアスペルギルス属由來の既知のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとは基質特異性が異なることが分かる。

【0020】3. pH及び温度の条件

pH条件の測定

0.1M酢酸、リン酸カリウム(K-P)、Tris-HCl及びグリシン(Gly)-NaOH緩衝液(pH 4.0~12.0)にFLD-Sを加え、30℃、10分間インキュベートした後、通常の条件(30℃、pH 8.0)で活性を測定した。

温度条件の測定

0.1M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)中で25~60℃の温度条件にFLD-Sを加え、10分間インキュベートした後、通常の条件で活性を測定した。上記方法で測定したとき、S-1F4由来のFLD-Sの安定なpH域は、pH 4.0~12.0、好ましくはpH 7.0~8.5であり、至適pHは7.0~9.0、好ましくは7.5~8.5、最も好ましくは8.0である(図3)

参照)。また、S-1F4由来のFLD-Sの安定な温度領域は20~55℃であり、30℃以上で徐々に失活し、60℃以上で完全に失活する。また、酵素反応は30~50℃、好ましくは40~50℃、より好ましくは45℃で効率良く進行する(図4参照)。

【0021】4. 力価の測定

酵素の力価測定は下記の方法で行った。

(1) 生成する過酸化水素を比色法により測定する方法

A. 速度法

5.0 mM FZL溶液はあらかじめ調製したFZLを蒸留水に溶解することによって調製した。4.5 mM 4-アミノアンチピリン、6.0 ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液、及び6.0 mM フェノール溶液それぞれ1.00 μlと、0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0) 1ml、及び酵素溶液5.0 μlを混合し、全量を蒸留水で2.9 mlとする。30℃で平衡化した後、5.0 mM FZL溶液1.00 μlを添加し、505 nmにおける吸光度を経時的に測定した。生成するキノン色素の分子吸光係数($5.16 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$)から、1分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位(ユニット: U)とする。

【0022】B. 終末法

上記A法と同様に処理し、基質添加後、30分間、30℃でインキュベートした後の505 nmにおける吸光度を測定し、あらかじめ標準過酸化水素溶液を用いて作成しておいた検量線から、生成した過酸化水素量を算出することにより、酵素活性を測定する。

(2) 酵素反応による酸素吸收を測定する方法

0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0) 1mlと酵素溶液5.0 μlを混合し、蒸留水で全量を2.9 mlとし、ランク ブラザーズ社の酸素電極のセルに入れる。30℃で攪拌し、溶存酸素と温度を平衡化した後、5.0 mM FZL 1.00 μlを添加し、酸素吸収を記録計で連続的

13

に計測し、初速度を得る。標準曲線から1分間に吸収された酸素量を求め、これを酵素単位とした。

【0023】5. 酵素の阻害、活性化及び安定化

(1) 金属の影響

0.1M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)の条件で、終濃度1 mMの各種金属イオンを添加し、5分間、30°Cでブレインキュベートした後、活性を測定した。結果を下記の表3に示す。

表3 金属イオンのS-1 F 4由来FLOD-S活性への影響

10

【表3】

原料 (1 mM)	比活性 (%)
なし	100
LiCl	100
KCl	104
NaCl	107
RbCl	103
CsCl ₂	102
MgCl ₂	75
CaCl ₂	77
MnCl ₂	154
FeSO ₄	97
CoSO ₄	42
CuCl ₂	0
ZnSO ₄	0
AgNO ₃	0
BaCl ₂	60
HgCl ₂	0
FeCl ₃	67

表3から明らかに、FLOD-Sの活性は、二価の金属イオンによって若干阻害され、銀イオン、水銀イオン、銅イオン、及び亜鉛イオンにより、完全に阻害される。

【0024】(2) 各種阻害物質の影響

上記(1)の金属イオンの影響に関する試験と同様の方法で試験した。但し、PCMB(パラクロロ安息香酸第二水銀)は終濃度0.1 mM、それ以外は1 mMとした。結果を下記の表4に示す。また、安定化の検討は、50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.5)に2 mMジチオスレイトール(DTT)を添加したものに対して一晩透析を行った後、活性を測定することにより行った。結果を下記の表4に示す。

表4 各種物質のS-1 F 4由来FLOD-S活性への影響

【表4】

50

試薬 (1 mM)	比活性 (%)
なし	100
パラクロロ安息香酸第二水銀*	0
5,5'-テオビス(2-ニトロフェノール)	95
ヨード酢酸	102
アジ化ナトリウム	101
α, α' -ジビリジル	106
0-フェナヌロレン	103
セミカルバジド	103
フェニルヒドラジン	2.6
ヒドラジン	13
ヒドロキシルアミン	21
クロルギニン	132
デブレニル	102
アミノケアニジン	66

* : 0.1 mM

表4から明らかに、FLOD-S活性はPCMB(パラクロロ安息香酸第二水銀)により、完全に阻害される。また、フェニルヒドラジン、ヒドラジンによても阻害される。これら阻害物質の影響は、酵素活性の発現にSH基、カルボニル基が関与していることを示唆している。他方、ジチオスレイトールによって安定化され、保存に適した溶媒はジチオスレイトール(DTT) 2 mMを添加した50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.5)である。

【0025】6. 分子量

分子量はセファクリルS-200を用いるカラムゲルろ過法、及びSDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動)で測定した。カラムクロマトグラフィは0.1M NaCl含有0.1M Tris-HCl緩衝液(pH 8.5)を用いて行った。分子量既知の数種のタンパクについても同様に行い、溶出位置から本酵素の分子量を求めた。SDS-PAGEはデービスの方法に従い、10%ゲルを用いて、40 mAで、3時間泳動し、タンパク染色は、クマシーブリリアントブルーG-250で行った。標準タンパクとしてホスピリーゼB、牛血清アルブミン、オボアルブミン、カルボニックアンヒドライゼ、大豆トリプシンインヒビターについても同様に泳動し、検量線から、分子量を求めた。測定の結果、S-1 F 4由来のFLOD-Sは、セファクリルS-200を用いるカラムゲルろ過法で測定した場合、分子量約45,000(45 kDa)であり、SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリ

15

ルアミドゲル電気泳動)で測定した場合、約50,000 (50 kDa)であった(図5、6参照)。

【0026】7. 等電点

- ディスク焦点電気泳動法によって測定した結果、S-1 F 4由来のF LOD-Sの場合、pI = 4.8であつた。

	フリウム・オキシスカルム S-1F4	コリネバクテリウム sp. ¹⁾	アスペルギルス sp. ²⁾
分子量(ケルカ)	45,000	88,000	83,000
分子量(SDS-PAGE)	50,000	44,000	43,000
補酵素	共有結合したFAD	非共有結合的に結合したFAD	非共有結合的に結合したFAD
フルクトシルリジン特異性	48.9 ³⁾	N.D. ⁴⁾	11.28 ⁵⁾
フルクトシルバリン特異性	N.D.	7.09	59.8
(U/mg タンパク)			
ミハエリス定数	0.22mM	0.74mM	2.2mM
	(フルクトシルリジンについて)	(フルクトシルグリシンについて)	(フルクトシルグリシンについて)
至適pH	8.0	8.3	7.7
SH試薬による不活化	あり	なし	あり
至適温度(°C)	45	40	40
等電点	4.8	4.6	6.8

1): ホリウチら (T. Horiuchi et al.) Agric. Biol. Chem., 53(1), 103-110(1989)

2): ホリウチら (T. Horiuchi et al.) Agric. Biol. Chem., 55(2), 333-338(1991)

3): フルクトシル-N^α-Z-リジンに対する比活性

4): N-ο-フルクトシル-N^α-ホルミルリジンに対する比活性

表5から、本発明のF LOD-Sと他の2種の菌株由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとの間に、下記の相違点が認められる。

(1) 分子量の相違：本発明のF LOD-Sが菌体内で、単量体として産生されているのに対し、他の2種の酵素は、菌体内で2量体として産生されている。

(2) 補酵素：F LOD-Sは補酵素として共有結合的に結合したFADを有するのに対し、他の酵素はいずれも非共有結合的に結合したFADを有する。

(3) 基質特異性：基質であるフルクトシルリジンに対する特異性の相違を示している。即ち、F LOD-Sはフルクトシルリジンに対して高い特異性を有する。一方、コリネバクテリウム属由来の酵素はフルクトシルリジンには作用せず、アスペルギルス属由来の酵素はフルクトシルリジンに作用するものの、フルクトシルバリンに対する活性に比べて、その活性が低い。

(4) ミハエリス定数：F LOD-Sの基質F Z Lに対する親和性は、他の酵素のそれよりも高いことを示している。

(5) 至適pH、至適温度、等電点、及びSH試薬によ

16

【0027】8. 既知の酵素との比較
既存の菌由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼと、本発明のS-1 F 4由来F LOD-Sとを比較した。

表5 種々の微生物由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの比較

【表5】

	フリウム・オキシスカルム S-1F4	コリネバクテリウム sp. ¹⁾	アスペルギルス sp. ²⁾
分子量(ケルカ)	45,000	88,000	83,000
分子量(SDS-PAGE)	50,000	44,000	43,000
補酵素	共有結合したFAD	非共有結合的に結合したFAD	非共有結合的に結合したFAD
フルクトシルリジン特異性	48.9 ³⁾	N.D. ⁴⁾	11.28 ⁵⁾
フルクトシルバリン特異性	N.D.	7.09	59.8
(U/mg タンパク)			
ミハエリス定数	0.22mM	0.74mM	2.2mM
	(フルクトシルリジンについて)	(フルクトシルグリシンについて)	(フルクトシルグリシンについて)
至適pH	8.0	8.3	7.7
SH試薬による不活化	あり	なし	あり
至適温度(°C)	45	40	40
等電点	4.8	4.6	6.8

る阻害：F LOD-Sと他の2酵素との相違を示している。

【0028】(I I) ギベレラ属によって産生されるF LOD類

該F LOD-G類は一般に、下記の理化学的特性を有する。

30 1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 α -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒し；
 2) 至適pHは8.0であり；
 3) 安定温度は20~50°C、至適温度は35°Cであり；
 4) スーパーデックス200 pgを用いたゲルろ過法で測定した場合、分子量は約47,000 (47 kDa)である。

【0029】該F LOD-Gの特性を詳細に説明する。

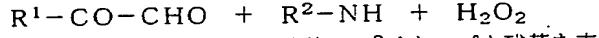
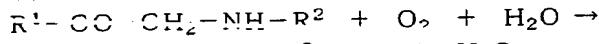
1. 一般的な誘導特性
 F LOD-Gはフルクトシルリジン及び/又はフルクトシル-N^α-Z-リジン(F Z L)によって誘導される誘導酵素であり、フルクトシルリジン及び/又はF Z Lを窒素源とし、グルコースを炭素源とするフルクトシルリジン及び/又はF Z L含有培地で、ギベレラ属のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生性菌株を培養することにより産生される。F LOD-Gは、グルコースとリジン及び/又はN^α-Z-リジンを共にオートクレーブして得られるG L褐変化培地で誘導されるが、グルコースとリジン及び/又はN^α-Z-リジンを別々にオートク

50

レープ処理して調製した培地では誘導されないことが
ら、該酵素はアマドリ化合物に特異的に作用するもので
ある。

【0030】2. 反応特異性及び基質特異性

本発明のFLOD-Gは、式：



(式中、R¹はアルドース残基、R²はタンパク残基を表す)で示される反応における触媒活性を有する。上記の

反応式において、R¹が-OH、-(CH₂)_n-、又は
-[CH(OH)]_n-CH₂OH (式中、nは0~6の整数)であり、R²が-CHR³-[CONHR³]_mCO

OH (式中、R³はα-アミノ酸側鎖残基、mは1~480の整数を表す)で示されるアマドリ化合物が基質として好ましい。中でも、R³がリジン、ポリリジン、バリン、アスパラギンなどから選択されるアミノ酸の側鎖残基であり、またnが5~6、mが55以下である化合物が好ましい。

【0031】本発明のFLOD-Gは、以下の表6に示すように、フルクトシルN^a-Z-リジンに対して高い特異性を有する。

10 表6 精製されたG. フジクロイ (IFO NO. 6356) 由来のFLOD-Gの基質特異性

【表6】

基質	濃度	比活性(%)
N'-フルクトシル N ^a -Z-リジン	1.67 mM	100
フルクトシルバリン	1.67	N. D.* ³
N'-メチル-L-リジン	1.67	N. D.
N'-フルクトシルポリ-L-リジン	0.02%	1.0
ポリ-L-リジン	0.02	N. D.
FBSA* ²	0.17	N. D.
FHSA* ³	0.17	N. D.
トリプチックFBSA	0.17	0.19
トリプチックFHSA	0.17	N. D.
トリプチック N'-フルクトシルポリ-L-リジン	0.17	59.7

*1：検出されず

*2：フルクトシル牛血清アルブミン

*3：フルクトシルヒト血清アルブミン

表6から、本発明のFLOD-Gはフルクトシルポリリジンに対する活性を有し、糖化タンパクのプロテアーゼ消化物に対する活性もある。

3. pH及び温度の条件

(I) の3と同様にpH条件の測定を行った結果、至適pHは8.0である(図7)。また、0.1M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)中で20~60°Cの温度条件にFLOD-Gを加え、10分インキュベートした後、通常の条件で活性を測定した。上記方法で測定したとき、本発明のFLOD-Gの安定な温度領域は20~50°C、好ましくは20~40°C、より好ましくは20°Cであり、酵素反応は、20~50°C、好ましくは20~40°C、より好ましくは35°Cで効率良く進行する(図8)。

【0032】4. 力値の測定

酵素の力値測定は下記の方法で行った。

(1) 生成する過酸化水素を比色法により測定する方
法

A. 速度法

100mM FZL溶液はあらかじめ得られたFZLを

蒸留水で溶解することによって調製した。4.5mM 4-アミノアンチビリン、6.0ユニット/mlオキシダーゼ溶液、及び6.0mM フェノール溶液それぞれ1.00μlと、0.1M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)1ml、及び酵素溶液5.0μlを混合し、全量を蒸留水で2.95mlとする。30°Cで平衡化した後、1.00mM FZL溶液5.0μlを添加し、505nmにおける吸光度を経時的に測定した。生成するキノン色素の分子吸光係数($5.16 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)から、1分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位(ユニット:U)とする。

【0033】B. 終末法

40 上記A法と同様に処理し、基質添加後、30分間30°Cでインキュベートした後の505nmにおける吸光度を測定し、あらかじめ標準過酸化水素溶液を用いて作成しておいた検量線から、生成した過酸化水素量を算出することにより、酵素活性を測定する。

(2) 酵素反応による酸素吸収を測定する方法

0.1M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)1mlと酵素溶液5.0μlを混合し、蒸留水で全量を3.0mlとし、ランク ブラザーズ社の酸素電極のセルに入れる。30°Cで攪拌し、溶存酸素と温度を平衡化した後、50mM FZL 1.00μlを添加し、酸素吸収を記録計で連続的

に計測し、初速度を得る。標準曲線から1分間に吸収された酸素量を求め、これを酵素単位とした。

【0034】5. 酵素の阻害、活性化及び安定化

(1) 金属の影響

0.1M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)の条件で、終濃度1mMの各、金属イオンを添加し、5分間30°Cでブレインキュベートした後、活性を測定した。結果を下記の表7に示す。

表7 金属イオンの、G. フジクロイ(IFO NO. 6356)由来FLOD-Gの活性への影響

【表7】

原料(1 mM)	比活性(%)	原料(1 mM)	比活性(%)
なし	100	FeSO ₄	74
LiCl	96	CoSO ₄	15
KCl	98	CuCl ₂	2
NaCl	97	ZnSO ₄	33
RbCl	97	AgNO ₃	0
CsCl	97	BaCl ₂	103
MgCl ₂	94	HgCl ₂	25
CaCl ₂	97	FeCl ₃	16
MnCl ₂	115		

試薬(1 mM)	比活性(%)	試薬(1 mM)	比活性(%)
なし	100	セミカルバジド	77
パラクロロ安息香酸第二水銀*	51	フェニルヒドラジン	13
5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)	76	ヒドラジン	14
ヨード酢酸	77	ヒドロキシルアミン	16
アジ化ナトリウム	78	デブレニル	81
α, α' -ジビリジル	78	アミノグアニジン	50
o-フェナヌスロリン	78	EDTA	81

*1 : 0.1 mM

表8から明らかに、FLOD-G活性はパラクロロ安息香酸第二水銀、ヒドラジン、フェニルヒドラジン、ヒドロキシルアミン及びアミノグアニジンにより、強く阻害され、酵素反応にはSH基及びカルボニル基が重要な働きをしていることが予想される。他方、ジチオスレイトによって安定化され、保存に適した溶媒はジチオスレイト2 mMを添加した50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.5)である。

【0036】6. 分子量

スーパーデックス200 pgによるゲルろ過法で求めた結果、分子量は約47,000(47 kDa)であった。

表7から明らかに、本発明のFLOD-Gの活性に対し、コバルトイオン、銅イオン、亜鉛イオン、水銀イオン及び鉄(III)イオンが阻害的であり、銀イオンは完全に阻害する。

【0035】(2) 各種阻害物質の影響

上記(1)の金属イオンの影響に関する試験と同様の方法で試験した。結果を表8に示す。安定化の検討は、50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.5)に2 mMジチオスレイト(DDT)を添加したものに対して一晩透析を行った後、活性を測定することにより行った。

表8 各種物質のFLOD-G活性への影響

【表8】

(図9)。また、SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動)は、(I)の6と同様の方法で行い、分子量を求めた結果、分子量は約52,000(52 kDa)であることが示された。

40 (図10)。従って、本発明のFLOD-Gは単量体であることが明らかである。

【0037】7. 既知の酵素との比較

既存の菌由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼと、本発明のFLOD-Gとを比較した。

表9 種々の微生物由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの比較

【表9】

产生菌	ギベレラ・フジクロイ IFO 6356	コリネバクテリウムsp. ¹⁾	アスペルギルス sp. ²⁾
分子量 (ゲル過) (SDS-PAGE)	47,000 52,000	88,000 44,000	83,000 43,000
補酵素	FADと共有結合	FADと非共有結合	FADと非共有結合
基質特異性(U/mg・タンパク) (フルクトシルアミノ酸)	48.3 ³⁾ N.D.	N.D. ⁴⁾ 7.09	11.28 ⁵⁾ 59.8
ミハエリス定数	0.13mM (FZLについて) ; フルクトシルグリシンについて : (フルクトシルグリシンについて)	0.74mM	2.2mM
至適pH	8.0	8.3	7.7
至適温度(°C)	35	40	40
SH試薬による 影響	あり	なし	あり

1): ホリウチら (T. Horiuchi et al.) Agric. Biol. Chem., 53(1), 103-110 (1989)

2): ホリウチら (T. Horiuchi et al.) Agric. Biol. Chem., 55(2), 333-338 (1991)

3): フルクトシル N^o-Z-リジンに対する比活性

4): N-o-フルクトシル N^o-ホルミルリジンに対する比活性

表9から、本発明のFLOD-Gと他の2種の菌株由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとの間に、下記の相違点が認められる。

(1) 分子量の相違：本発明のFLOD-Gは、単量体として產生されているのに對し、他の2種の酵素は二量体として產生されている。

(2) 補酵素：FLOD-Gは補酵素として共有結合的に結合したFADを有するのに對し、他の酵素はいずれも非共有結合的に結合したFADを有する。

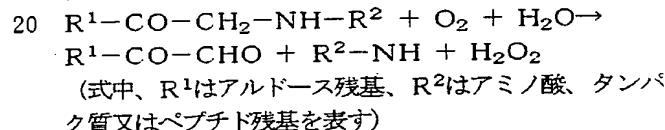
(3) 基質特異性：FLOD-Gは、フルクトシルバリンには作用せず、フルクトシルリジンに特異的であるが、コリネバクテリウム属由来の酵素はフルクトシルリジンには作用せず、アスペルギルス属由来の酵素はフルクトシルリジンに作用するものの、フルクトシルバリンに対する活性に比べて、その活性が低い。

(4) ミハエリス定数：FLOD-Gの基質フルクトシルリジンに対する親和性が、他の酵素のそれよりも高いことを示している。

(5) 至適pH、至適温度、及びSH試薬による阻害等の差異はFLOD-Gと他の2酵素との相違を示している。

【0038】既述のごとく、フサリウム属及びギベレラ属由来の菌により、本発明方法に従って產生されたFLODは、アマドリ化合物の定量に有用である。従って、本発明はまた、アマドリ化合物を含有する試料と、本発明のFLODとを接觸させ、酵素の消費量又は過酸化水素の発生量を測定することを特徴とする、試料中のアマドリ化合物の分析法を提供するものである。本発明の分

析法は、生体成分中の、糖化タンパクの量及び/又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量に基づいて行われる。FLODの酵素活性は下記の反応に基づいて測定される。



被検液としては、アマドリ化合物を含有する任意の試料溶液を用いることができ、例えは、血液（全血、血漿又は血清）、尿等の生体由来の試料の外、醤油等の食品が挙げられる。

【0039】本発明のFLODをアマドリ化合物含有溶液に、適當な緩衝液中で作用させる。反応溶液のpH及

30 び温度は、それぞれ、使用する酵素に適した条件とする。即ち、FLOD-Sの場合、pH 4.0～12.0、好ましくはpH 8.0、温度20～55°C、好ましくは30～45°C、より好ましくは45°Cで行う。また、FLOD-Gの場合、pH 4.0～12.0、好ましくは8.0、温度は20～50°C、好ましくは35°Cである。FLODの使用量は、終点分析法においては通常、0.1ユニット/ml以上、好ましくは1～100ユニット/mlである。緩衝液としてはTris-HCl等を用いる。

40 【0040】本発明の分析法では、下記のいずれかのアマドリ化合物の定量法を用いる。

(1) 過酸化水素発生量に基づく方法

当該技術分野で既知の過酸化水素の定量法、例えは、発色法、過酸化水素電極を用いる方法等で測定し、過酸化水素及びアマドリ化合物の量に関して作成した標準曲線と比較することにより、試料中のアマドリ化合物を定量する。具体的には、上記(I), 4又は(II), 4に記載の力価測定法に準じる。ただし、FLOD量は1ユニット/mlとし適当に希釈した試料を添加し、生成する過酸化水素量を測定する。過酸化水素発色系としては、4

23

—アミノアンチピリン／フェノール系のかわりに4—アミノアンチピリン／N—エチル-N—(2—ヒドロキシ-3—スルホプロピル) —m—トルイジン、4—アミノアンチピリン／N,N—ジメチルアニリン、4—アミノアンチピリン／N,N—ジエチルアニリン、MBTH／N,N—ジメチルアニリン、4—アミノアンチピリン／2、4—ジクロロフェノール等の組み合わせが可能である。

(2) 酵素の消費量に基づく方法

反応開始時の酵素量から反応終了時の酵素量を差し引いた値(酵素消費量)を測定し、酵素消費量とアマドリ化合物の量に関して作成した標準曲線と比較することにより、試料中のアマドリ化合物を定量する。具体的には、上記(I)、4又は(I I)、4の力価の測定に準じて行う。但し用いるFLOD量は1ユニット／mlとし、適当に希釈した試料を添加し吸収される酵素量を求める。

【0041】本発明方法は試料溶液をそのまま用いて行うこともできるが、対象となる糖化タンパクによっては、あらかじめ糖が結合したリジン残基を遊離させてから行なうことが好ましい。そのような目的には、タンパク質分解酵素を用いる場合(酵素法)と、塩酸等の化学物質を用いる場合(化学法)があるが、前者が好ましい。本発明方法に用いることができるタンパク質分解酵素は、当業者に既知であり、トリプシン、カルボキシペプチダーゼB、パシペイン、アミノペプチダーゼ、キモトリプシン、サーモリシン、ズブシリシン、プロティナーゼK、プロナーゼ等を挙げることができる。酵素処理の方法も既知であり、例えばトリプシン処理は、下記実施例に記載の方法で行なうことができる。

【0042】上記のごとく、本発明のFLODは、糖化タンパクに含まれるフルクトシルリジンに高い基質特異性を有するものであることから、血液試料中の糖化タンパクを測定することを含む、糖尿病の診断などに有用である。このように、検体として血液試料(全血、血漿又は血清)を用いる場合、採血した試料をそのまま、あるいは透析等の処理をした後、用いる。さらに、本発明方法に用いるFLOD、ペーオキシダーゼ等の酵素は、溶液状態で用いてもよいが、適当な固体支持体に固定化してもよい。例えば、ビーズに固定化した酵素をカラムに充填し、自動化装置に組み込むことにより、臨床検査など、多数の検体の日常的な分析を効率的に行なうことができる。しかも、固定化酵素は再使用が可能であることから、経済効率の点でも好ましい。さらには、酵素と発色素とを適宜組み合わせ、臨床分析のみならず、食品分析にも有用なアマドリ化合物の分析のためのキットを得ることができる。

【0043】酵素の固定化は当該技術分野で既知の方法により行なうことができる。例えば、担体結合法、架橋化法、包括法、複合法等によって行う。担体としては、高

10

分子ゲル、マイクロカプセル、アガロース、アルギン酸、カラギーナン、などがある。結合は共有結合、イオン結合、物理吸着法、生化学的親和力を利用し、当業者既知の方法で行う。固定化酵素を用いる場合、分析はフロー又はバッチ方式のいずれでもよい。上記のごとく、固定化酵素は、血液試料中の糖化タンパクの日常的な分析(臨床検査)に特に有用である。臨床検査が糖尿病診断を目的とする場合、診断の基準としては、結果を糖化タンパク濃度として表すか、試料中の全タンパク質濃度

に対する糖化タンパク質の濃度の比率(糖化率)又はフルクトサミン値で表される。全タンパク質濃度は、通常の方法(280nmの吸光度、Lowry法あるいは、アルブミンの自然蛍光など)で測定することができる。

【0044】本発明はまた本発明のFLODを含有するアマドリ化合物の分析試薬又はキットを提供するものである。本発明のアマドリ化合物の定量のための試薬は、本発明のFLOD、好ましくはpH7.5～8.5、より好ましくはpH8.0の緩衝液からなる。該FLODが固定化されている場合、固体支持体は高分子ゲルなどから選択され、好ましくはアルギン酸である。試薬中のFLODの量は、終点分析を行う場合、試料あたり、通常1～100ユニット／ml、緩衝液はTris-HCl(pH8.0)が好ましい。過酸化水素の生成量に基づいてアマドリ化合物を定量する場合、発色系としては、上記と同様、4—アミノアンチピリン／フェノール系のかわりに4—アミノアンチピリン／N—エチル-N—(2—ヒドロキシ-3—スルホプロピル) —m—トルイジン、4—アミノアンチピリン／N,N—ジメチルアニリン、4—アミノアンチピリン／N,N—ジエチルアニリン、MBTH／N,N—ジメチルアニリン、4—アミノアンチピリン／2、4—ジクロロフェノール等の組み合わせが可能である。本発明のアマドリ化合物の分析試薬と、適当な発色剤並びに比較のための色基準あるいは標準物質を組み合わせて、予備的な診断、検査に有用なキットすることができる。上記の分析試薬およびキットは、生体成分中の、糖化タンパクの量及び/又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンを定量するために用いられるものである。以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。

40 【0045】

【実施例】

実施例1 F.オキシスポルムS-1F4由来のFLOD-Sの製造及び精製

F.オキシスポルムS-1F4 (Fusarium oxysporum S-1F4 : FERMB P-5010)をFZL 0.5%、グルコース 1.0%、リン酸二カリウム0.1%、リン酸一ナトリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.05%、塩化カルシウム 0.01%、イーストエキス0.2%を含有する培地(pH6.0)10Lに植菌し、ジャーファーメンターを用いて通気量2L／分、攪拌速度400rpmの条件で2

50

8°C、24時間攪拌培養した。培養物はろ過して集めた。菌糸体の一部(200g)を、2mMのDTTを含む、0.1M Tris-HCl塩酸緩衝液(pH 8.5)1Lに懸濁し、ダイノミルにより菌糸体を破碎した。破碎液を10,000rpmで15分間遠心分離し、得られた液を粗酵素液(無細胞抽出液)とした。粗酵素液に40%飽和になるように硫酸アンモニウム(以下、硫酸と略す)を加え、攪拌し、12,000rpmで10分間遠心分離した。得られた上清に75%飽和になるように硫酸を加え、攪拌し、12,000rpmで10分間遠心分離した。沈殿を2mMのDTTを含有する50mM Tris-HCl塩酸緩衝液(pH 8.5)(以下、緩衝液Aと略す)に溶解し、緩衝液Aにて一晩透析した。透析物を緩衝液Aにて平衡化したDEAE-セファセルカラムに吸着した。同緩衝液Aにて洗浄した後、0-0.5Mの塩化カリウム直線濃度勾配で溶出した。活性画分を集め、55%から75%の硫酸分画に供し、緩衝液Aにて一晩透析した。透析物に25%飽和になるように硫酸を加え、25%飽和硫酸を含む緩衝液Aで平衡化したフェニルートヨパールカラムに吸着した。同緩衝液にて洗浄した後、硫酸濃度25-0%飽和の直線勾配で溶出した。活性画分を集め、40%飽和になるように硫酸を添加し、40%飽和硫酸を含む緩衝液Aで平衡化したブチルートヨパールカラムに吸着した。同緩衝液にて洗浄した後、硫酸濃度40-0%飽和の直線濃度勾配にて溶出した。活性画分を集め、80%飽和となるように硫酸を添加し、攪拌後、12,000rpm、10分間遠心分離し、得られた沈殿を0.1Mの緩衝液Aに溶解した。その酵素溶液を0.1M塩化カリウムを含有する、0.1M緩衝液Aで平衡化したセファクリルS-200ゲルろ過クロマトグラフィに供した。活性画分を集め、限外濾過で濃縮した。濃縮物をアルマシアFPLCシステムでMono Qカラムを用いて処理すること(緩衝液Aを用いた塩化カリウムの0-0.5M直線濃度勾配による溶出)により、30~60ユニットの精製酵素を得た。

【0046】精製酵素のUV吸収スペクトルを図11に示す。図11は、本酵素がフラビン酵素であることを示唆している。また、該精製酵素標品を用いて、セファクリルS-200を用いるカラムゲルろ過法、及びドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下、SDS-PAGEと称する)で分子量を測定した。カラムクロマトグラフィは0.1M NaCl含有0.1M Tris-HCl緩衝液(pH 8.5)を用いて行った。分子量既知の数種のタンパクについても同様に行い、溶出位置から本酵素の分子量を求めた。SDS-PAGEは標準タンパクとしてホスピリーゼB、牛血清アルブミン(BSA)、オボアルブミン、カルボニッケンヒドライゼ、大豆トリプシンインヒビターを用い、デービスの方法に従って分子量を測定した。即ち、10%ゲルを用いて、40mAで、3時間泳動し、タンパク

染色は、クマシーブリリアントブルーG-250で行った。検量線から、分子量を求めた。測定の結果、S-1F4由来のFLOD-Sは、セファクリルS-200を用いるカラムゲルろ過法で測定した場合、分子量約45,000(45kDa)であり、SDS-PAGEで測定した場合、約50,000(50kDa)であった(図5、○参照)。さらに、本実施例で調製したFLOD-Sの酵素活性、pH及び温度安定性、金属及び阻害物質による影響などに関する記載の各項に記載の値又は性質を示した。

【0047】リジン残基にグルコースが結合している[J.Biol.Chem.26:13542-13545(1986)]糖化ヒト血清アルブミン(glycated human serum albumin; シグマ社)を糖化タンパク基質として用い、上記実施例で調製した精製FLOD-Sを用いて定量した。

実施例2 糖化アルブミン濃度の定量

1) トリプシン処理

試薬の調製

A: 2%トリプシン溶液 [0.1M Tris-HCl 塩酸緩衝液(pH 8.0)に溶解]

B: 4.5 mM 4-アミノアンチピリン水溶液

C: 6.0 mM N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン

D: 6.0 ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液

E: 1.4 ユニット/ml FLOD-S

Eの1.4ユニット/ml FLOD-S液は以下の方法で調製した。即ち、実施例1で得たF.オキシスポルムS-1F4由来の精製FLOD-Sを1.4ユニット/mlになるように蒸留水で希釈した。FLOD反応液は0.1M Tris-HCl 塩酸緩衝液(pH 8.0)10mlにB-E液それぞれ1ml加え、蒸留水にて全量を30mlとすることにより調製した。トリプシン処理は、種々の濃度(0-1.0%)の糖化ヒト血清アルブミン(シグマ社)30μlと同量のA液とを混合し、37°C、60分間インキュベートすることにより行った。

【0048】2) 定量

トリプシン処理した反応液にFLOD反応液1ml加え、30°C、30分間インキュベートした後、555nmにおける吸光度を測定した。結果を図12に示す。図中、縦軸は555nmの吸光度(過酸化水素量に対応)、横軸は糖化アルブミンの濃度を表す。図は、糖化アルブミン濃度と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示している。

【0049】実施例3 ヒト血清アルブミンの糖化率の測定

0.9%塩化ナトリウム水溶液3mlに、糖化ヒト血清アルブミン(シグマ社)150mg、ヒト血清アルブミン(シグマ社)150mgをそれぞれ溶解した。これらの溶液を混合することにより、糖化率の異なる溶液を作成し、自動グリコアルブミン測定装置(京都第一科学)を

用いて検定したところ、その糖化率は、24.1%~5
1.9%であった。これらの溶液を用いて前処理混合物

糖化アルブミン溶液	190 μl
6mg/ml プロテイナーゼK (シグマ社)	20 μl
6mg/ml プロナーゼE (シグマ社)	20 μl
1.25% SDS	20 μl

これらの混合物を55°Cで30分間インキュベートし
た。その後、各前処理試料から1部を取り出し、以下の

4.5mM 4-アミノアンチピリン溶液	70 μl
6.0mM フェノール溶液	70 μl
6.0ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液	70 μl
0.1M Tris-HCl塩酸緩衝液 (pH 8.0)	700 μl
11.5ユニット/ml FLOD-S溶液	30 μl

蒸留水で全量を2mlとした。11.5ユニット/ml FLOD-S溶液は、実施例1の方法で得たFLOD-Sを11.5ユニット/mlになるよう、0.1M Tris-HCl塩酸緩衝液 (pH 8.0) で希釈して調製した。この反応液を30°Cでインキュベートし、各処理試料を100 μl加え、30分後の505nmにおける吸光度を測定した。この方法で得られるアルブミンの糖化率と吸光度との関係を図13に示す。図中、縦軸は505nmの吸光度 (過酸化水素の量に対応)、横軸はアルブミンの糖化率を表す。図は、アルブミンの糖化率と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示している。

【0050】実施例4 血液試料中の糖化タンパクの定量

糖尿病患者血清を基質として用い、実施例1で精製したFLOD-Sを用いて血中糖化タンパクを実施例2の方法で定量した。従来、糖尿病患者の血糖管理指標としては血清中のフルクトサミンや全血中のヘモグロビンA1c (HbA1c) 値が用いられている。本実施例では、外来糖尿病患者の血液試料を用いて、本発明のFLOD-Sを用いた酵素法による糖化タンパク (血清アルブミン) 測定と、従来から用いられている指標との相関の程度を検討した。結果を図14、15に示す。図中の縦軸は555nmの吸光度 (過酸化水素量に対応)、横軸は試料とした患者血清中のフルクトサミン値 (図14)、全血中のヘモグロビンA1c値 (図15) を示す。それぞれの図はFLOD-Sを用いた糖化タンパクの測定結果と従来の糖尿病患者の血糖管理指標との間に相関関係があることを示している。即ち、本発明方法の指標としての有用性が確認された。また、HbA1c、フルクトサミン値の高い患者は糖化タンパク (血清アルブミン) 値も高くなるはずである。フルクトサミンは血清中のタンパクが糖化されたものであるため、その主成分であるアルブミンの生体内での寿命とよく相関する。しかし、HbA1cは、ヘモグロビンとアルブミンの生体内での寿命が異なり、また糖化部位がバリン残基であることから、糖化タンパクとの相関は、フルクトサミンと糖化タンパクとの相関よりも劣ると予想される。図14及び1

を次のように調製した。

ように調製された反応液に加えた。

5から、このことを読み取ることができる。
 【0051】実施例5 G. フジクロイ (IFO NO. 6356) 由来のFLOD-Gの製造及び精製
 G. フジクロイ (IFO NO. 6356; *Gibberella fujikuroi*) をFZL 0.5%、グルコース 1.0%、リソ酸二カリウム 0.1%、リソ酸ナトリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.05%、塩化カルシウム 0.01%、イーストエキス 0.2%を含有した培地 (pH 6.0) 10Lに植菌し、ジャーファーメンターを用いて通気量 2L/分、攪拌速度 400 rpm の条件で 28°C、24 時間攪拌培養した。培養物は廻過して集めた。菌糸体 170g (湿重量) を、2 mM のDTT を含む、0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) 1L に懸濁し、ダイノミルにより菌糸体を破碎した。破碎液を 10, 000 rpm で 15 分間遠心分離し得られた液を粗酵素液 (無細胞抽出液) とした。粗酵素液に 40% 飽和になるように硫安を加え、攪拌し 12, 000 rpm で 10 分間遠心分離した。得られた上清に 7.5% 飽和になるように硫安を加え、攪拌し、12, 000 rpm で 10 分間遠心分離した。沈殿を 2 mM のDTT を含有する 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) (緩衝液 A) に溶解し、緩衝液 A にて一晩透析した。透析物を緩衝液 A にて平衡化した DEAE-セファセルカラムに吸着した。緩衝液 A にて洗浄した後、0~0.5M の塩化カリウム直線濃度勾配で溶出した。活性画分を集め、5.5% から 7.5% の硫安分画に供し、緩衝液 A にて一晩透析した。透析物に 2.5% 飽和になるように硫安を加え、2.5% 飽和硫安を含む緩衝液 A で平衡化したフェニルートヨバールカラムに吸着した。同緩衝液にて洗浄した後、硫安濃度 2.5~10% 饱和の直線勾配で溶出した。活性画分を集め、4.0% 饱和になるように硫安を添加し、4.0% 饱和硫安を含む緩衝液 A で平衡化したブチルートヨバールカラムに吸着した。同緩衝液にて洗浄した後、硫安濃度 4.0~0% 饱和の直線濃度勾配にて溶出した。活性画分を集め、8.0% 饱和となるように硫安を添加し、攪拌後、12, 000 rpm、10 分間遠心分離し、得られた沈殿を 0.1M の緩衝液 A に溶解した。その酵素溶液を 0.1M 塩化

リウムを含有する、0.1M緩衝液Aで平衡化したセファクリルS-200ゲル濾過クロマトクラフィーに供した。活性画分を集め、限外濾過で濃縮した。濃縮物をアルマシアFPLCシステムでMono Qカラムを用いて処理すること(緩衝液Aを用いた塩化カリウムの0-0.5M直線濃度勾配による溶出)により、30~60ユニットの精製酵素を得た。

【0052】得られた精製酵素標品をSDS-PAGEにおいて、標準タンパクとしてホスホリラーゼB、牛血清アルブミン(BSA)、オボアルブミン、カルボニッケアンヒドライゼ、大豆トリプシンインヒビターを用い、デービスの方法に従って分子量を測定した。即ち、10%ゲルを用いて、40mAで3時間泳動し、クマシープリリアントブルーG-250でタンパク染色を行った。検量線から分子量を求めた結果、サブユニットの分子量は約52,000(52kDa)であることが示された(図10)。また、スーパーデックス200pgに

4.5 mM 4-アミノアンチピリン溶液	50 μl
6.0 mM フェノール溶液	50 μl
6.0ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液	50 μl
0.1M Tris-HCl 1M緩衝液(pH 8.0)	500 μl
7.6ユニット/ml FLOD-G溶液	30 μl

蒸留水で全量を1300μlとした。7.6ユニット/ml FLOD-G溶液は、実施例5の方法で得たギベレラ由来のFLOD-Gを7.6ユニット/mlになるよう、0.1M Tris-HCl 1M緩衝液(pH 8.0)で希釈して調製した。この反応液を30°Cでインキュベートし、各処理試料を200μl加え、30分後の505nmにおける吸光度を測定した。この方法で得られるフルクトサミンと吸光度との関係を図16に示す。図中、縦軸は505nmの吸光度(過酸化水素の量に対応)、横軸はフルクトサミン値を表す。図は、フルクトサミン値と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示している。

糖化アルブミン溶液	190 μl
6mg/ml プロティナーゼK(シグマ社)	20 μl
6mg/ml プロナーゼE(シグマ社)	20 μl
1.25% SDS	20 μl

これらの混合物を55°Cで30分間インキュベートした。その後、各前処理試料から一部を取り出し、以下の

4.5 mM 4-アミノアンチピリン溶液	70 μl
6.0 mM フェノール溶液	70 μl
6.0ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液	70 μl
0.1M Tris-HCl 1M緩衝液(pH 8.0)	700 μl
7.6ユニット/ml FLOD-G溶液	30 μl

蒸留水で全量を2mlとした。この反応液を30°Cでインキュベートし、各処理試料を100μl加え、30分後の505nmにおける吸光度を測定した。この方法で得られるアルブミンの糖化率と吸光度との関係を図17に示す。図中、縦軸は505nmの吸光度(過酸化水素の量に對応)、横軸はアルブミンの糖化率を表す。図は、アル

よりゲルろ過による分子量測定では、図9の検量線図から明らかのように、約47,000(47kDa)であった。本実施例で調製したFLOD-Gの酵素活性、pH及び温度安定性、金属及び阻害物質による影響などに関する記載の値又は性質を示した。

【0053】実施例6 フルクトシルポリリジンの定量
0.1%のフルクトシルポリリジン溶液をBMY・NTT検定法を用いて検定したところ、750 μmol/lのフルクトサミンを含有することが分かった。この溶液を蒸留水で希釈することにより、0~750 μmol/lの範囲で変化する一連の試料を作成した。各希釈液について、同量の0.05%トリプシンと混合し、37°Cで1時間インキュベートした。その後、各前処理試料から一部を取り出し、以下のように調製された反応液に加えた。

4.5 mM 4-アミノアンチピリン溶液	50 μl
6.0 mM フェノール溶液	50 μl
6.0ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液	50 μl
0.1M Tris-HCl 1M緩衝液(pH 8.0)	500 μl
7.6ユニット/ml FLOD-G溶液	30 μl

【0054】実施例7 ヒト血清アルブミンの糖化率の測定
0.9%塩化ナトリウム水溶液3mlに、糖化ヒト血清アルブミン(シグマ社)150mg、ヒト血清アルブミン(シグマ社)150mgをそれぞれ溶解した。これらの溶液を混合することにより、糖化率の異なる溶液を作成し、自動グリコアルブミン測定装置(京都第一科学)を用いて検定したところ、その糖化率は、24.1%~51.9%であった。これらの溶液を用いて前処理混合物を次のように調製した。

糖化アルブミン溶液	190 μl
6mg/ml プロティナーゼK(シグマ社)	20 μl
6mg/ml プロナーゼE(シグマ社)	20 μl
1.25% SDS	20 μl

ように調製された反応液に加えた。

4.5 mM 4-アミノアンチピリン溶液	70 μl
6.0 mM フェノール溶液	70 μl
6.0ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液	70 μl
0.1M Tris-HCl 1M緩衝液(pH 8.0)	700 μl
7.6ユニット/ml FLOD-G溶液	30 μl

ブミンの糖化率と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示している。

【0055】

【発明の効果】本発明のFLODは、従来の同種の酵素フルクトシルアミノ酸オキシダーゼとは基質特異性において異なり、フルクトシルリジンに特異的に作用する。

従つて、新たな臨床分析及び食品分析法の開発に有用であり、糖尿病の診断や食品の品質管理の面で寄与するところが大きい。特に、血中の糖化タンパクの量及び／又は糖化率を指標として、糖尿病の病状の診断に役立つと考えられる。また、本発明のFLODを用いるアマドリ化合物の分析試薬及び分析方法によつて、正確に糖化タンパクを定量することができ、糖尿病の診断、症状管理に貢献することができる。さらに、本発明のフルクトシルリジン及び／又はFZL製造方法によりフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生菌のスクリーニング及び／又は培養に有用なフルクトシルリジン及び／又はFZLを容易に得ることができる。また、このフルクトシルリジン及び／又はFZLを含有するGL褐色変化培地は、FLOD産生菌の培養を効率良く行う上で有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】1%のN^ε-Z-リジンをオートクレーブ処理することによるフルクトシルN^ε-Z-リジンの生成量とグルコース濃度との関係を示すグラフ。

【図2】FLODの培養培地での産生量と培養時間の関係を示すグラフ。

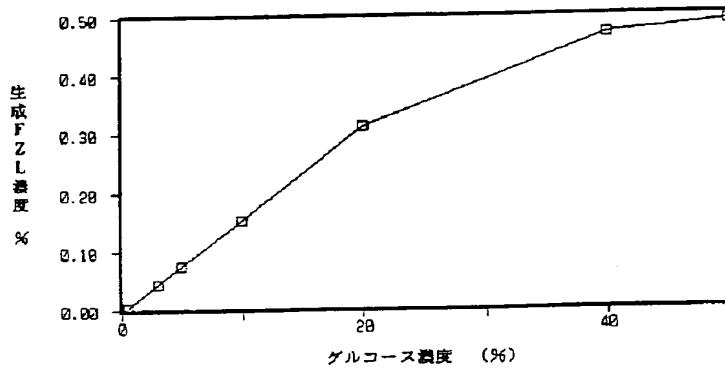
【図3】S-1F4由来FLOD-Sの溶媒中での活性とpHの関係を示すグラフ。

【図4】S-1F4由来FLOD-Sの溶媒中での活性と温度の関係を示すグラフ。

【図5】セファクリルS-200を用いたゲルろ過によるS-1F4由来FLOD-Sの分子量測定の結果を示すグラフ。

【図6】S-1F4由来精製FLOD-SをSDS-PAGEにかけて得た電気泳動による移動パターンを示す

【図1】



写真の模写図。

【図7】ギベレラ由来FLOD-Gの溶媒中での活性とpHの関係を示すグラフ。

【図8】ギベレラ由来FLOD-Gの溶媒中での活性と温度の関係を示すグラフ。

【図9】ギベレラ由来精製FLOD-Gをスーパーディスクス200pgを用いたゲルろ過により分子量測定した結果を示すグラフ。

【図10】ギベレラ由来精製FLOD-GをSDS-PAGEにかけて得た電気泳動による移動パターンを示す写真の模写図。

【図11】精製S-1F4由来FLOD-Sの吸収スペクトル。

【図12】基質として用いた糖化ヒト血清アルブミンの濃度と、FLOD作用により生成された過酸化水素の量との関係を示すグラフ。

【図13】アルブミンの糖化率と、FLOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

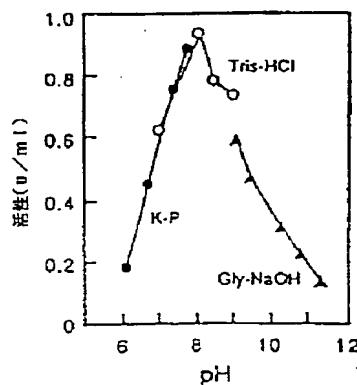
【図14】糖尿病患者の血清中のフルクトサミン値とFLOD-Sによる糖化タンパク濃度測定値との関係を示すグラフ。

【図15】糖尿病患者の全血中のヘモグロビンA1c値とFLOD-Sによる糖化タンパク濃度測定値との関係を示すグラフ。

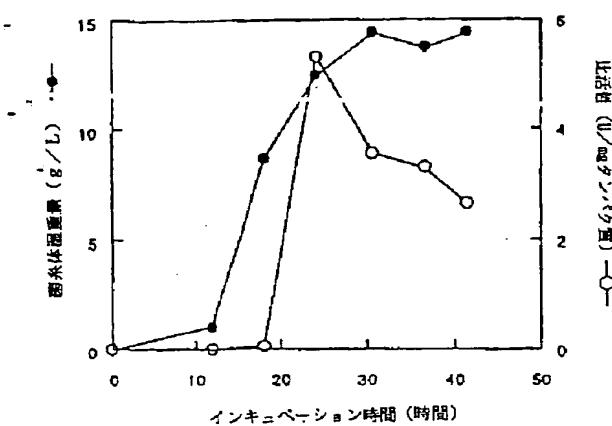
【図16】フルクトサミン値と、FLOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

【図17】アルブミンの糖化率と、FLOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

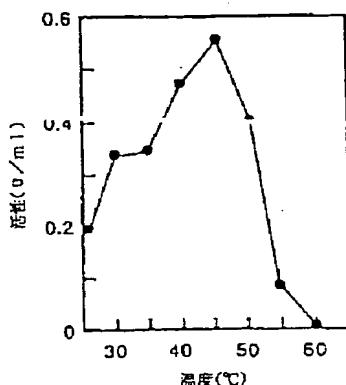
【図3】



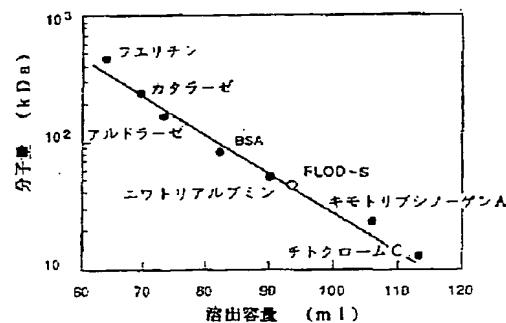
【図2】



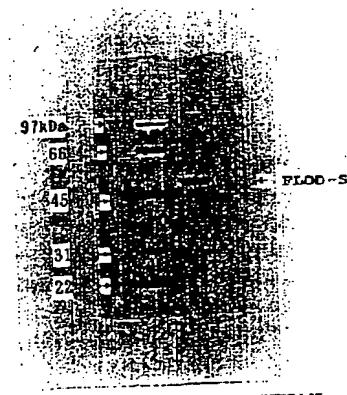
【図4】



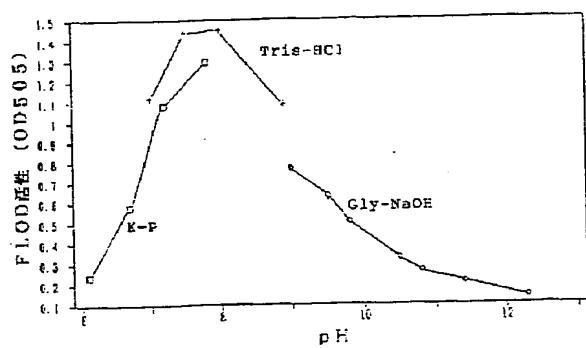
【図5】



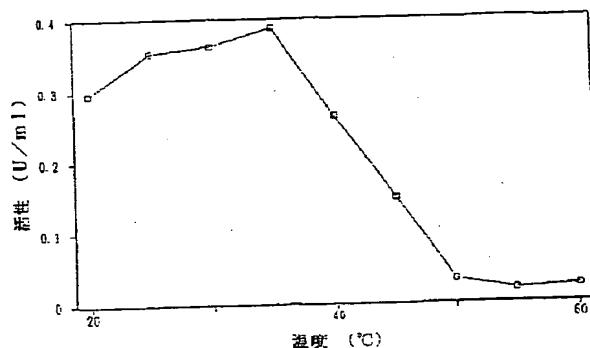
【図6】



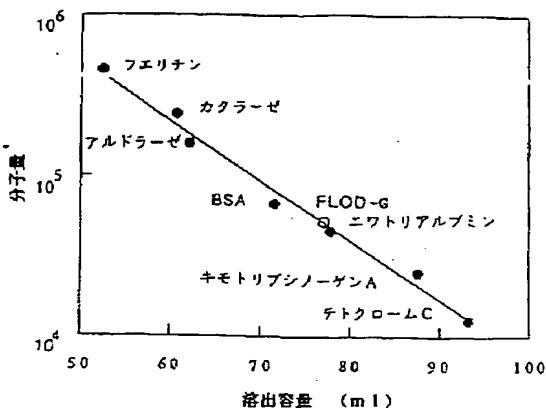
【図7】



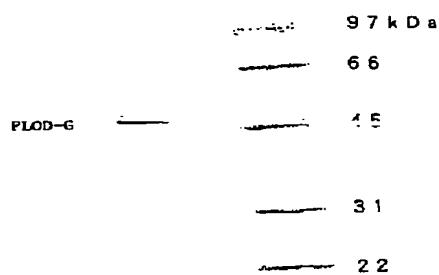
【図8】



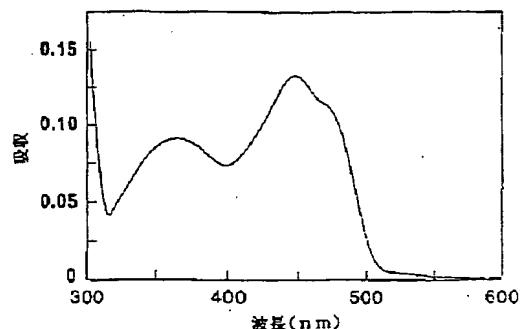
【図9】



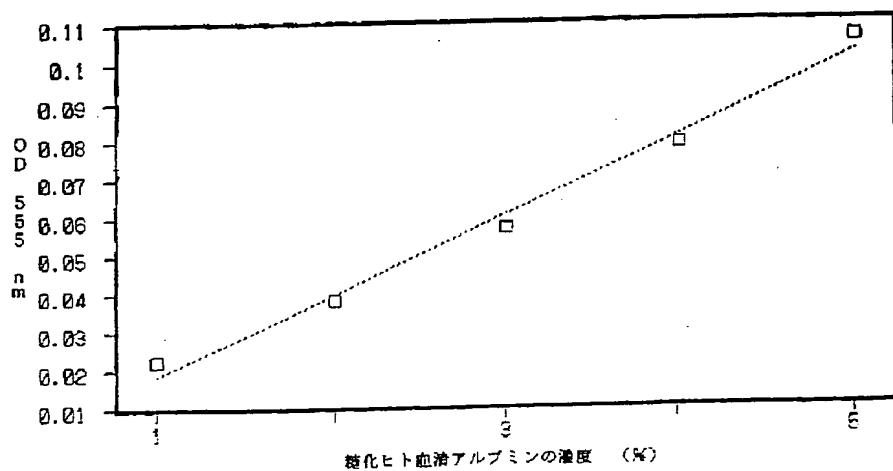
【図10】



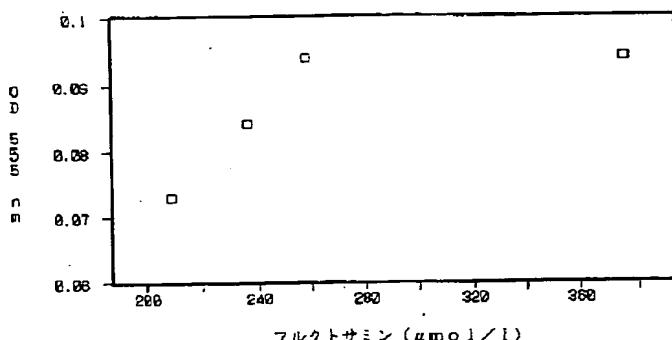
【図11】



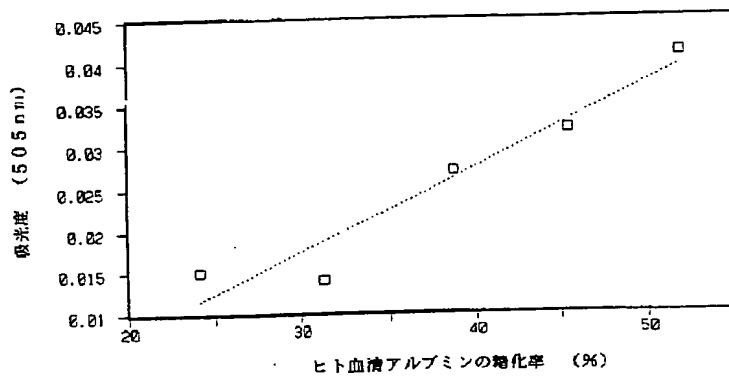
【図12】



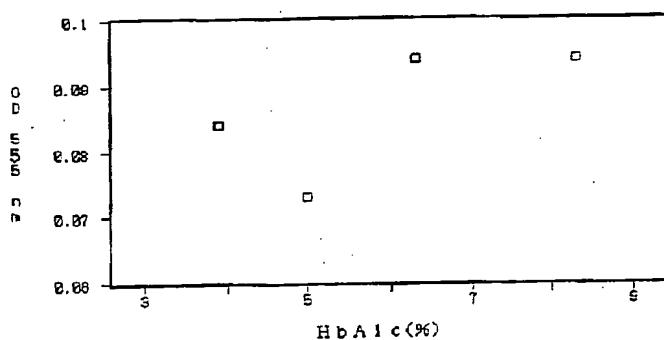
【図14】



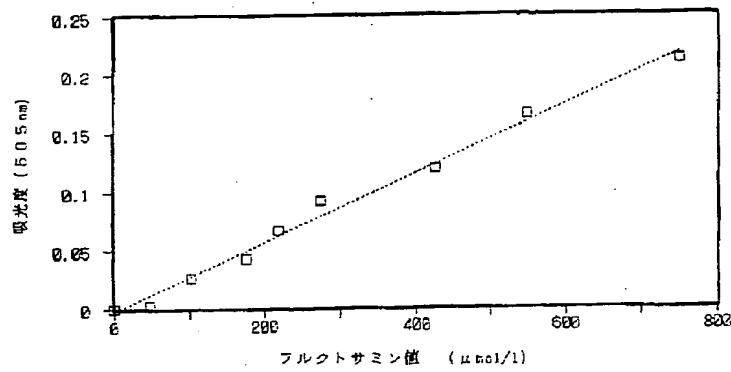
【図13】



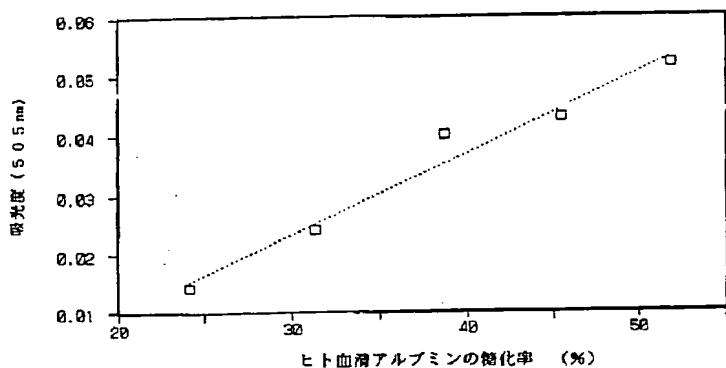
【図15】



【図16】



【図17】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶
 C 12 R 1:645)
 (C 12 N 9/06
 C 12 R 1:77)
 (C 12 N 1/14
 C 12 R 1:77)
 (C 12 N 1/14
 C 12 R 1:645)

識別記号 庁内整理番号 F I

技術表示箇所

(72) 発明者 八木 雅之
 京都府京都市右京区西京極三反田町1 西
 京極四丁目4棟302号室

(72) 発明者 船津 文代
 大阪府枚方市茄子作4丁目40番2号